

修 士 論 文 の 和 文 要 旨

研究科・専攻	大学院 電気通信学研究科 量子・物質工学専攻 博士前期課程		
氏 名	加藤 彰久	学籍番号	0533016
論 文 題 目	味細胞に発現する G 蛋白質に対する抗体の作製		

<背景及び目的>

苦味、甘味及び旨味の各味刺激は味細胞に存在する G 蛋白質共役型受容体 (G-protein coupled receptor, GPCR) によって認識されることがわかっているが、それぞれの味の情報変換機構に關与する G 蛋白質の種類についてはほとんどわかっていない。味細胞に特異的な G 蛋白質である Ggust の遺伝子をノックアウトしたマウスにおいて、苦味と甘味の感受性が著しく低下するということは報告されているが、Ggust と同じ G ファミリーである G α 2 の関与も報告されるなど、味覚の情報変換機構に關与する G 蛋白質については、依然として不明な点が多い。そこで本研究ではトプシンアッセイにより味細胞における Ggust 及び G α 2 の活性化を研究することを計画した。トプシンアッセイとは G 蛋白質の活性化状態によってトプシンによる切断部位が変化するという性質を利用した方法で、トプシンによって切断された G 蛋白質を、抗体を用いたウェスタンブロット解析により検出するものである。しかしながら、市販されている Ggust 及び G α 2 の抗体にはトプシンアッセイに使用可能なものが見当たらないため、自ら抗体を作製することにした。

<実験>

pET-42b(+)-ベクター又は pMAL-c2xベクターに Ggust 又は G α 2 に特異的な塩基配列を挿入し、大腸菌 TOP10 を形質転換して培養し、プラスミドを抽出した。

DNA シーケンサーを用いて目的の塩基配列が挿入されていることを確認した。

で抽出したプラスミドにより蛋白質発現用の大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換して培養し、PTG (isopropyl β -thiogalactoside) を加えて融合蛋白質を発現誘導させた。

超音波破碎機で大腸菌を破碎した後、超遠心分離をして上清をカラムに通して精製した。

融合蛋白質によりマウス BALB/c を免疫した。

ELISA により抗体価をチェックした。

抗体価が飽和した時点で血液を採取し、ウェスタンブロット解析を行った。

<結果>

融合蛋白質に組み込んだ Ggust 及び G α 2 の配列に対して抗体ができていることは確認できた。しかしながら、Ggust の融合蛋白質を免疫して得られた血清は、乳頭にある Ggust を認識することができず、また、G α 2 の融合蛋白質を免疫して得られた血清は、有郭乳頭及び大脳にある G α 2 を認識することができなかった。融合蛋白質における G 蛋白質の一部の立体構造と、生体内の G 蛋白質の立体構造が異なるため、産生された抗体が生体内の G 蛋白質を認識できないという可能性は大いに考えられる。